



TITLE:

腎細胞癌及び膀胱腫瘍のマイクロサテライト領域における遺伝子変異の検討

AUTHOR(S):

松田, 久雄; 上島, 成也; 栗田, 孝

CITATION:

松田, 久雄 ...[et al]. 腎細胞癌及び膀胱腫瘍のマイクロサテライト領域における遺伝子変異の検討. 泌尿器科紀要 1996, 42(1): 27-31

ISSUE DATE:

1996-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115656>

RIGHT:

腎細胞癌および膀胱腫瘍のマイクロサテライト 領域における遺伝子変異の検討

近畿大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 栗田 孝教授)

松田 久雄, 上島 成也, 栗田 孝

MICROSATELLITE INSTABILITY IN RENAL CELL CARCINOMA AND BLADDER TUMORS

Hisao MATSUDA, Shigeya UEJIMA and Takashi KURITA

From the Department of Urology, Kinki University School of Medicine

We investigated the reduction in the accuracy of DNA replication and repair (i.e. genetic instability) in urinary tract malignancy using microsatellite regions. The subjects were 17 patients with renal cell carcinoma and 14 with bladder tumors. After polymerase chain reaction (PCR) was performed with FITC-labeled primers, CA repeats were analyzed. The primers used were D2S123, D3S1067, and TP53. Tissue positive for all 3 primers was considered to show a replication error (RER). Genetic instability was found in 5 out of 17 patients with renal cell carcinoma (29%) and 3 out of 14 patients with bladder tumors (21%). Among the bladder tumor patients, 2 were positive for only TP53 and 1 was considered to have RER. Among the patients with renal cell carcinoma, one was positive only for D3S1067 and the other 4 were considered to have RER.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 27-31, 1996)

Key words: Genetic instability, Renal cell carcinoma, Bladder tumor

緒 言

最近の多くの研究により、大腸癌、乳癌その他多くの癌は癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの一連の遺伝子の変化により発癌・増殖する、という「多段階発癌説」が提唱されている。この「多段階発癌説」の機序のひとつとして、体細胞分裂時における DNA 複製の正確性や修復機能の低下の可能性があげられる。ごく最近、この DNA 複製の正確性の低下すなわち、染色体の不安定性 (genetic instability) を効率よく検出する方法として、マイクロサテライト領域を用いた方法が注目されつつある。今回、腎細胞癌および膀胱腫瘍における染色体不安定性につき検討した。

対 象

対象症例は、近畿大学泌尿器科および関連病院にて1994年8月から1995年2月までの6カ月間に手術された腎細胞癌17例および膀胱腫瘍14例を対象とした。腎細胞癌症例の平均年齢は58.4歳 (35~75)、男女比は12:5であった。異型度別では G1 (6例), G2 (7例), G3 (4例) であり深達度別では pT1 (5例), pT2 (8例), pT3 (4例) であり pT4 はなかった。

膀胱腫瘍症例は膀胱全摘術症例であり、平均年齢は65.7歳 (35~75)、男女比は5:2であった。病理組織はすべて移行上皮癌であった。異型度別では G1 (1

例), G2 (11例), G3 (2例) また深達度別では pT1 (8例), pT2 (3例), pT3 (2例), pT4 (1例) であった。

方 法

腫瘍摘出標本の一部組織を採取し、DNA 抽出測定までの無処置のままマイナス80度で凍結保存した。非腫瘍部分のコントロールは、その患者の末梢血リンパ球を用いた。

DNA の抽出は、フェノール-クロロホルム法^{1,2)} に準じて行った。DNA 抽出後、マイクロサテライト領域の解析を Fig. 1 のごとく行った。マイクロサテライトのジヌレオチド (CA) 繰り返し回数 (CA リピート) 解析するため、マイクロサテライト領域をさむ領域の 5' プライマーと 3' プライマーを用いた PCR 法によりプライマーに挟まれた領域を増幅させた。5' プライマーは FITC により蛍光標識しており、その PCR 増幅産物の泳動距離、すなわち蛍光標識された増幅産物の塩基配列の長さをシーケンサーで決定することにより CA リピートを解析した。FITC 標識プライマーは大塚アッセイ研究所より提供された、2番染色体短腕 (D2S123), 3番染色体短腕 (D3S1067), 17番染色体短腕 (TP53) の3種を使用した。染色体不安定性陽性は、Fig. 2 に示すごとく正常部のヘテロ接合性と癌部分とのピークのずれ、ある

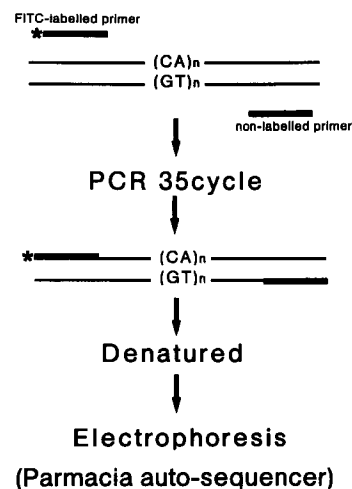


Fig. 1. Method of Genetic Instability

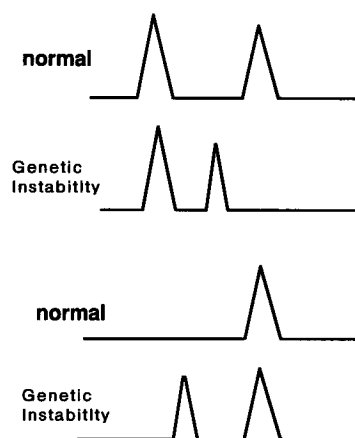


Fig. 2. Pattern of Genetic Instability

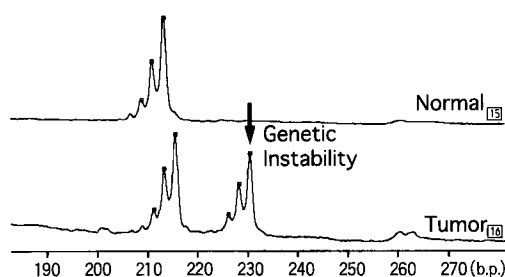


Fig. 3. Example of Genetic Instability at loci chromosome 17p (renal cell carcinoma; case 6)

いはホモ接合からヘテロ接合性への変化の有無により判定した。Fig. 3 に染色体不安定性陽性例を示す。正常では 210~218 b.p. にピークがあるだけであるが腫瘍では 225~233 b.p. に新たなピークが出現している。

染色体不安定性試験で 3つのプライマーが重複して陽性のものを Replication error (以下 RER) 陽性と判定した。

また、同時にヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) についても検討した。LOH 陽性の判定は Fig. 4 に示すごとく片方の対立遺伝子の消失を

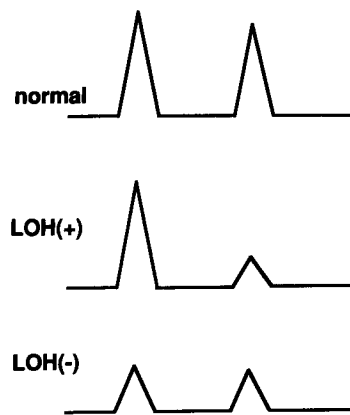


Fig. 4. Pattern of LOH

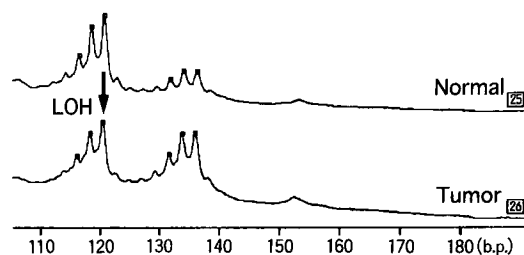


Fig. 5. Example of LOH at loci chromosome 3p (renal cell carcinoma; case 14)

Table 1. Frequency of Genetic Instability in various cancers by site

Cancer site	No. of tumors with alteration			Total genetic instability
	D2S123	D3S1067	TP53	
Bladder	1/14 (7)	1/14 (7)	3/14 (21)	3/14 (21)
Kidney	4/17 (24)	5/17 (29)	4/17 (24)	5/17 (29)

(%)

観察した。Fig. 5 に LOH 陽性例を示す。115~125 b.p. と 130~140 b.p. とのピークの高さの割合が、腫瘍では前者が正常に比べ低くなっている。

染色体不安定性試験および LOH の陽性症例数の数え方は、2つ以上のプライマーが陽性であってもその患者の陽性例としては 1 症例とし、総陽性例 1 例と表記した。

結 果

腎細胞癌、膀胱腫瘍の染色体不安定性陽性例は腎細胞癌 17 例中で総陽性例 5 例 29%、膀胱腫瘍 14 例中で総陽性例 3 例 21%であった。

膀胱腫瘍では TP53 のみ陽性が 2 例、RER 陽性例が 1 例であった。腎細胞癌では D3S1067 のみ陽性が 1 例、他の 4 例は RER 陽性であった (Table 1)。

年齢、性別の影響は腎細胞癌、膀胱腫瘍ともになかった。

1. 腎細胞癌

腎細胞癌の異型度別の頻度 (Fig. 6) では、LOH に

Table 2. Frequency of Genetic Instability in each histopathological type of renal cell carcinoma

Case	Age	Sex	Grade	Stage	Histological classification	No. of tumors with alteration		
						D2S123	D3S1067	TP53
1	63	F	1	pT1	Alveolar, clear cell	—	+	—
2	47	M	1	pT1	Alveolar, clear cell	—	—	—
3	75	F	1	pT1	Alveolar, clear cell	—	—	—
4	42	M	1	pT1	Alveolar, clear cell	—	—	—
5	60	M	2	pT1	Alveolar, clear cell	—	—	—
6	72	F	1	pT2	Tubular, granular cell	+	+	+
7	42	F	1	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
8	64	M	2	pT2	Alveolar, granular cell	+	+	+
9	35	M	2	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
10	50	M	2	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
11	60	M	2	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
12	72	M	3	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
13	56	M	3	pT2	Alveolar, clear cell	—	—	—
14	70	M	2	pT3	Alveolar, clear cell	+	+	+
15	72	F	2	pT3	Alveolar, clear cell	—	—	—
16	52	M	3	pT3	Solid, spindle cell	+	+	+
17	60	M	3	pT3	Alveolar, clear cell	—	—	—

において G1 で総陽性例 2 例 (33%), G2 で総陽性例 1 例 (14%), G3 で総陽性例 1 例 (25%) であり異型度と、特に関係はみられなかった。

染色体不安定性において G1, G2 に各総陽性例 2 例を認め, G1 では 32%, G2 では 28% となったが G3 でも総陽性例 1 例 (25%) 認めた。染色体不安定性と異型度とは特に関係は見られなかった。また, RER 陽性のものは G1 で 1 例 (16%), G2 で 2 例 (28%),

G3 は 1 例 (25%) であり, RER に関しても異型度との関係は見られなかった (Table 2)。

腎細胞癌の深達度別の検討 (Fig. 7) では, LOH は pT1 では TP53 のみで 1 例 (20%) しか認めないものの pT2 で総陽性例 2 例 (25%), pT3 でも総陽性例 2 例 (25%) であった。染色体不安定性は pT1 で D3S1067 に 1 例 (20%), pT2 で総陽性例 2 例 (25%) であるが pT3 では総陽性例 2 例 (50%) となった。RER 陽性でみると, pT1 では 0%, pT2 で 25%, pT3 では 50% と RER では深達度があるほど高くなった (Table 2)。

2. 膀胱腫瘍

膀胱腫瘍においては LOH では異型度で見た場合

Table 3. Frequency of Genetic Instability in each histopathological type of bladder tumor

Case	Age	Sex	Grade	Stage	No. of tumors with alteration		
					D2S123	D3S1067	TP53
1	64	M	1	pT1	—	—	+
2	67	M	1	pT1	—	—	+
3	61	F	2	pT1	—	—	—
4	55	M	2	pT1	—	—	—
5	77	M	2	pT1	—	—	—
6	35	M	2	pT1	—	—	—
7	70	M	2	pT1	—	—	—
8	68	F	2	pT1	—	—	—
9	62	M	2	pT2	—	—	—
10	68	F	2	pT2	—	—	—
11	64	M	3	pT2	—	—	—
12	76	M	2	pT3b	+	+	+
13	74	F	2	pT3b	—	—	—
14	46	M	3	pT4	—	—	—

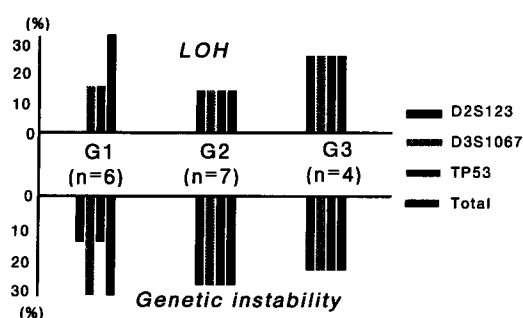


Fig. 6. Frequency of LOH and Genetic Instability in each grade by renal cell carcinoma

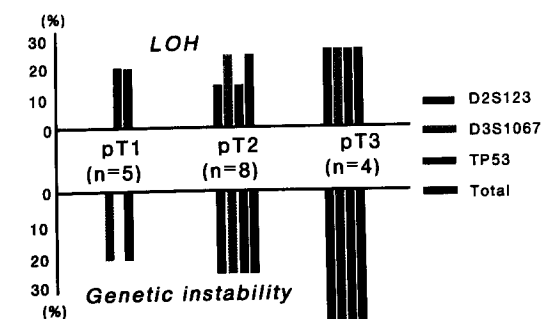


Fig. 7. Frequency of LOH and Genetic Instability in each stage by renal cell carcinoma

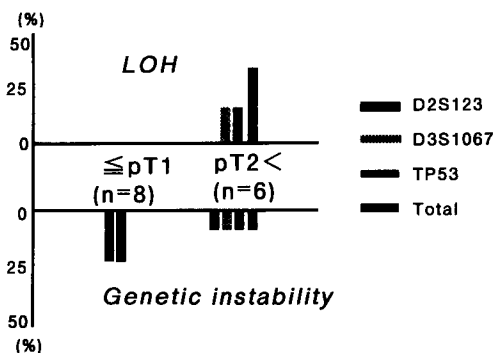


Fig. 8. Frequency of LOH and Genetic Instability in each stage by bladder tumors

G1ではなく、G2で11例中1例（9%）にTP53のみ陽性例を認めた。G3でも2例中1例にD3S1067のみの陽性を認めた。染色体不安定性に関してはTP53がG1で1例中1例、G2でも11例中1例（9%）に陽性であった。しかしG3ではRER陽性例が2例中1例認めた（Table 3）。

深達度別（Fig. 8）ではLOHはpT3でTP53に2例中1例、pT4でD3S1067に1例中1例に認めた。これをpT2以上で見た場合、2つのプライマー陽性例が6例中2例（33%）であった。

染色体不安定性についてみる（Table 3）。pT1はTP53で8例中2例（25%）、pT3でRER陽性を認める症例が3例中1例（33%）あった。これをpT1以下、pT2以上で分けると≤pT1で25%、pT2<では17%認めている。RERでみるとpT3で2例中1例（50%）のみであった。

また興味深いことに、膀胱腫瘍の染色体不安定性陽性例の2例は1例が咽頭癌、肺癌、膀胱腫瘍、他の1症例は前立腺癌と膀胱腫瘍の重複癌症例であった。前者はG1, pT1, 後者はG2, pT1であり、ともにTP53のみが陽性であった。

考 察

癌患者のゲノムは正常細胞ではまったく同じなのに、癌細胞のゲノムだけが正常細胞のそれと異なっていることが知られている。このような例として、癌細胞にみられる癌遺伝子の点突然変異、癌抑制遺伝子を含む領域のヘテロ接合性の消失（LOH）などがあげられる。このような癌細胞に特有なゲノムの相違箇所（遺伝子の傷）が癌細胞の無秩序な増殖や転移といった癌細胞に特有な性質を与えている。LOHに関しては泌尿器癌においても種々の報告例がある。Brewsterら³⁾は前立腺腫瘍に関してはDCC（Deleted in Colorectal Carcinoma; chromosome 18q21.3）、APC（Adenomatous Polyposis Coli; 5q21）、p53（17p13）のLOHが潜伏癌では2/15（13%）であるものが進行癌では10/14（71%）と前立腺癌の進展に影響を与えて

いると報告しており、またSakrら⁴⁾は前立腺腫瘍stage D1の原発腫瘍巣と転移巣の間で8番染色体短腕遺伝子座位でのLOHの不一致を認め、遺伝子異常は原発巣と転移巣では異なることが示唆された結果であったと報告している。腎細胞癌ではFosterら⁵⁾は3番染色体短腕に1つあるいはそれ以上のLOHを認めた腎細胞癌は55例中35例（64%）であったとしている。われわれの検討でもD3S1067にかざれば17例中3例と低いが、彼らの検討は3番染色体短腕で8カ所の遺伝子座位別プライマーの検討であり1つのプライマーにかざれば20%前後となり、われわれと同じ頻度の陽性率と思われた。膀胱腫瘍でもKnowlesら⁶⁾は83例の移行上皮癌につき39種のプライマーを検討した結果、組織学的異型度が低く比較的予後良好なG1, G2の群で9番染色体長腕、11番染色体短腕のLOHがそれぞれ57%、32%の頻度で起こり、異型度の高い予後不良なG3の群では、これらのLOHに加えp53の変異、17番染色体短腕のLOHなどが生じると報告している。

癌細胞のゲノムの正常細胞との相違点が、複数の癌関連遺伝子上での傷としてゲノムの様々な領域で蓄積することによって、癌は進展し、さらに悪性化する。いいかえるとDNA配列が正しく複製されないということが、発癌や癌の進展、悪性化におけるひとつの重要な過程であり、その結果として、さまざまな癌関連遺伝子に異常が生じ変化することで「多段階発癌」が進行するとVogelsteinら^{7,8)}は提唱している。彼らはマイクロサテライトの繰り返し回数の変化という手段を用いて癌細胞のDNA複製の正確性の低下（genetic instability）を解析した。Vogelsteinらは345種のマイクロサテライト領域について解析した結果、2番染色体短腕のD2S123（2p15-16）のマイクロサテライト領域が家族性非ポリポーシス大腸癌（Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer 以下 HNPCC）の家系における癌の発症とリンケージし、D2S123というマイクロサテライト領域の近傍に発癌にかかわる遺伝子が存在する可能性が高いことを発見した。さらにHNPCCが発症した14例中11例にRERが認められたが、その11例中10例はD2S123で染色体不安定性が検出された。すなわち、発癌にかかわる遺伝子の近傍の領域に染色体不安定性が高い頻度で確認された。Nordenskjöldら⁹⁾の報告では、同様のHNPCCの家系の癌組織に、2番染色体短腕に加え、3番染色体短腕（D3S1029）にもRERが認められている。またSchaidら¹⁰⁾は結腸癌患者においてもRERが検出されたと報告している。

Hanら¹¹⁾は非遺伝性大腸癌とHNPCCにつき従来の遺伝子解析結果と染色体不安定性の結果を比較検討しているが、K-rasの12, 13番目コドンの変異、P53

遺伝子産物のイムノヒストケミストリーによる変異の検出, APC 遺伝子の変異による終止コドンの導入などの解析結果, その頻度に大きな差は認められなかったと報告している。彼らはまた膀胱癌, 胃癌, 卵巣癌, 子宮癌, 結腸癌, 乳癌, 肝癌について 2 番染色体短腕 (D2S123, D2S136), 3 番染色体短腕 (D3S1067), 17 番染色体短腕 (TP53) の領域のマイクロサテライトの染色体不安定性を検出し, それぞれの癌での染色体不安定性試験陽性の頻度と臨床との関連につき解析した。特に膀胱癌では 67% であったが, 胃癌の場合, 分化型胃癌では 17%, 未分化型胃癌では 64% と未分化に高頻度に RER が検出されたと報告している。この結果は, 癌細胞の性格と染色体不安定性が関連している可能性を示唆している。われわれの検討した腎細胞癌では 24%, 膀胱腫瘍では 14% であり子宮癌, 卵巣癌, 結腸癌における陽性率と同程度であった。これらの悪性度との相関については言及されていないが, 腎細胞癌, 膀胱腫瘍においては異型度と特に関係は認められなかった。しかし腎細胞癌においては深達度別の検討では, 深達度が増すほど陽性率が高くなる傾向が見られ, とくに RER は深達度との関係が示唆される結果であった。しかし膀胱腫瘍については深達度の低い方で染色体不安定性が高くなる傾向がみられた。また染色体不安定性試験陽性例に重複癌が多かったことより癌体質的な素因を染色体不安定性は推測するものである可能性が示唆された。しかし, 症例数が腎細胞癌 17 例, 膀胱腫瘍 14 例と少なく, また使用したプライマーも FITC で標識されたものが 3 種のみであったため今後症例数, プライマー数を増やし検討していく必要がある。

少なくとも正常細胞と比較し, 癌細胞のゲノム上には replication error が検出され, このことは DNA 複製の正確性の低下による genetic instability が癌細胞のひとつの特徴であることが明らかである。しかし, この genetic instability がさらに他の癌関連遺伝子に具体的にどのような影響を与えるかについては現在のところ不明である。しかし癌遺伝子, 癌抑制遺伝子による多段階発癌の“黒幕”としての遺伝子不安定性は今後検討していかなければならないと思われる。

結 語

1. 2 番染色体短腕 (D2S123), 3 番染色体短腕

(D3S1067), 17 番染色体短腕 (TP53) の 3 種のプライマーを使用して膀胱腫瘍および腎細胞癌について染色体不安定性を検討した。

2. 染色体不安定性試験は, 腎細胞癌で 17 例中 5 例 (29%), 膀胱腫瘍では 14 例中 3 例 (21%) に陽性であった。

文 献

- 1) Kunkel LM: Analysis of human y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 1245-1249, 1977
- 2) 村上龍文, 前田秀一郎: Southern blot hybridization. *日臨* **47**: 113-123, 1989
- 3) Simon FB, Sara B and Keith WB: Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. *J Urol* **151**: 1073-1077, 1994
- 4) Sakr WA, Macoska JA, Benson P, et al.: Allelic loss in locally metastatic, multisampled prostate cancer. *Cancer Res* **54**: 3273-3277, 1994
- 5) Foster K, Crossey PA, Cairns P, et al.: Molecular genetic investigation of sporadic renal cell carcinoma analysis of allele loss on chromosomes 3p, 5q, 11p, 17 and 22. *Br J Cancer* **69**: 230-234, 1994
- 6) Knowles MA, Elder PA, Williamson M, et al.: Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* **54**: 531-538, 1994
- 7) Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al.: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* **260**: 810-812, 1993
- 8) Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al.: Clues to the patho-genesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**: 810-812, 1993
- 9) Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, et al.: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature Genetics* **5**: 279-282, 1993
- 10) Thibodeaus SN, Bren G and Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**: 816-819, 1993
- 11) Han HJ, Yanagiwa A, Kato Y, et al.: Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* **53**: 5087-5089, 1993

(Received on June 26, 1995)

(Accepted on October 3, 1995)

(迅速掲載)